



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

TÍTULO

**Eficacia antimicótica del extracto acuoso de *Origanum vulgare* “orégano”
sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con metronidazol,
estudio in vitro.**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE MEDICO CIRUJANO

AUTOR

Alva Pretell, Jennifer Alexandra

ASESORES

DRA. LLAQUE SÁNCHEZ, MARÍA ROCÍO DEL PILAR

MG. BLGO. POLO GAMBOA, JAIME

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

Trujillo – Perú

2018

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a dos grandes personas que han estado conmigo en cada paso de mi carrera, son mis padres Nelly y Henry, por acompañarme en esta lucha de ser mejor cada día, por sus consejos y palabras de aliento, por enseñarme a que se puede llegar a lograr tus sueños siempre que te lo propongas siempre que te esfuerces y confíes en ti mismo, gracias porque sin su esfuerzo no hubiese podido lograrlo, han llegado a ser mi motivación para llegar a terminar este logro tan valioso para mí. Esto es por ustedes.

A Un angelito que me ilumina desde el cielo, eres tú pequeña hermana Jennifer Soledad, a pesar de no poder tenerte físicamente llegamos juntas a este mundo, gracias por iluminarme y ser parte de esta motivación, aquí esta frase en tu honor cuando empieces a creer en ti el cielo será el límite.

A mi hermana, Stephany, porque con su ejemplo me ha ayudado a seguir sus pasos, porque al ser la mayor eres quien más ha estado conmigo en cada etapa de mi carrera, por haberme impulsado a seguir en los momentos más difíciles para mí, por haber sido mi amiga y a la vez madre por preocuparte por mí, porque siempre haber confiado en mí y decirme lo especial que soy y lo grande que puedo llegar a ser.

A mi hermana, Angie porque desde pequeña me llena de orgullo saber que quieres seguir mis pasos, no dudare en que yo estaré a tu lado siendo tu apoyo como tú ahora eres el mío, estoy segura de que serás una gran profesional.

A mis familiares, tíos primos, abuelos y a mis amigos, docentes, por su confianza por sus consejos y apoyo para motivarme en este largo, pero gratificante camino en mi sueño de ser médico.

AGRADECIMIENTO

A DIOS

A nuestro señor Dios por haberme permitido tener los honores de poder llegar a salvar vidas y ayudar a quienes lo necesitan.

A MIS ASESORES

Decana de la facultad de Ciencias Médicas UCV- Trujillo, Dra. Amalia Vega, al director de la Escuela de Medicina Dr. Campos Gil, Áureo; a mis asesores Dr. Jaime Polo y Dra. Llaqué Sánchez, María rocío del pilar, por su preciada ayuda y paciencia para lograr la ejecución de esta investigación.

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, Jennifer Alexandra Alva Pretell, estudiante de la carrera profesional de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo-Trujillo, identificado con DNI 74991007, con la tesis titulada:

“Eficacia antimicótica del extracto acuoso de *Origanum vulgare* “orégano” sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con Metronidazol. Estudio in vitro.”

Declaro bajo juramento que:

- 1) La tesis es de mi autoría.
- 2) He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
- 3) La tesis no ha sido auto plagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
- 4) Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y, por tanto, los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

De identificarse la falta de fraude (datos falsos), plagio (información sin citar a autores), auto plagio (presentar como nuevo algún trabajo de investigación propio que ya ha sido publicado), piratería (uso ilegal de información ajena) o falsificación (representar falsamente las ideas de otros), asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, diciembre del 2018

PRESENTACIÓN

Señores miembros del jurado:

Me es grato presentar mi tesis titulada “Eficacia antimicótica del extracto acuoso de *Origanum vulgare* “orégano” sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con Metronidazol. Estudio in vitro”, con la finalidad de determinar el nivel de acción antimicótica de una planta de uso doméstico, comercial y muy común conocida por nuestra población peruana además de compararla con un antimicótico certificado como es el Metronidazol, todo esto en cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, para obtener el Título Profesional de Médico Cirujano.

Jennifer Alexandra Alva Pretell

INDICE

PÁGINA DEL JURADO	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	iv
PRESENTACIÓN	v
INDICE	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	1
1.2. TRABAJOS PREVIOS	2
1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA	4
1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	8
1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	8
1.6. HIPÓTESIS	8
1.7. OBJETIVOS	9
1.7.1. OBJETIVO GENERAL.....	9
1.7.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	9
II. MÉTODO	9
2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:	9
TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico.....	9
2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN.....	11
2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	12
3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD	13
2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	13
3.6. ASPECTOS ÉTICOS:.....	14
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSIÓN:.....	17
IV. CONCLUSIÓN:.....	20
V. RECOMENDACIONES	21
VI. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	22

VII. ANEXOS.....	25
ANEXO 01	25
ANEXO 02	26
ANEXO N°06	36
DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN SOBRE CEPAS DE	36
ANEXO 07	37
ANEXO 08	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 09	39
ANEXO 10	39

RESUMEN

Se realizó un estudio experimental in vitro con el objetivo de evaluar la efectividad antimicótica del extracto acuoso de *Origanum vulgare* “orégano” sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, Se realizaron cuatro diluciones (100%, 75%, 50% y 25%) con control neutro con DMSO; se realizaron 19 repeticiones por cada grupo de estudio. Se obtuvo que el Extracto de *Origanum vulgare*, mostró halos de inhibición a partir de la dilución al 75% 11.10 mm (DS: 5.68 ± 0.180 . IC95% (10.60 -11.51)) con un rango de 10 a 12 mm, mayor fue el halo de inhibición a la concentración del 100% con 14.50 mm (DS: 1.080 ± 0.342 IC95% (13.73-15.27)) con un rango de 13 a 16 mm, considerándose resistente según el CLSI; el grupo control de metronidazol, tuvo un halo de inhibición de 25.90 mm (DS: 8.76 ± 2.77 IC95% (25.27-26.53)) con un rango de 25 a 27 mm. El análisis estadístico ANOVA fue altamente significativo (0.000), al igual que la prueba de Tukey demostró que los grupos evaluados fueron homogéneos y el grupo con mayor halo de inhibición fue para metronidazol, seguido del extracto acuoso al 100% de la planta en estudio evidenciándose que a mayor concentración el halo de inhibición aumentaba. Se concluye que el extracto etanólico de *Origanum vulgare* “orégano” si tiene efecto antimicótico sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, pero menor que metronidazol según el CLSI. Pudiendo ser este producto utilizado como un tratamiento alternativo en las infecciones vaginales principalmente las candidiasis vaginales.

Palabras claves: Extracto acuoso, *Origanum vulgare*, *Cándida albicans*, efectividad antimicótica.

ABSTRACT

An in vitro experimental study was carried out with the objective of evaluating the antifungal effectiveness of the aqueous extract of *Origanum vulgare* "oregano" on *Candida albicans* ATCC 10231. Four dilutions were made (100%, 75%, 50% and 25%) and a control neutral with DMSO; 19 repetitions were performed for each study group. It was obtained that the extract of *Origanum vulgare*, showed halos of inhibition from the dilution to 75% shows a halo of inhibition 11.10 (DS: 5.68 ± 0.180 , 95% CI (10.60 -11.51)) with a range of 10 to 12 mm of inhibition halo. The inhibition halo was greater at the 100% concentration with 14.50 mm (DS: 1.080 ± 0.342) IC95% (13.73-15.27)) with a range of 13 to 16 mm of inhibition halo and the group Metronidazole control, had an inhibition halo of 25.90 mm (DS: 8.76 ± 2.77). IC95% (25.27-26.53)) with a range of 25 to 27 mm halo inhibition. The ANOVA statistical analysis was highly significant (0.000), just as the Tukey test showed that the groups evaluated were homogeneous and the group with the highest halo of inhibition was for metronidazole. Followed by the aqueous extract to 100% of the plant under study showing that at higher concentration the inhibition halo increased. It is concluded that the ethanolic extract of *Origanum vulgare* "oregano" if it has an antimonic effect on *Candida albicans* ATCC 10231, but less than metronidazole. This product can be used as an alternative treatment in vaginal infections, mainly vaginal candidiasis.

Keywords: Aqueous extract, *Origanum vulgare*, *Candida albicans*, antifungal effectiveness.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

En el Perú, así como también en diversos territorios a nivel internacional, diversos organismos vivos que pertenecen al reino vegetal tienen diversidad de propiedades medicinales que actualmente promueven y son de mucha ayuda para la terapéutica medicinal como terapia alternativa en medicina complementaria tradicional. Dentro de nuestra silvestre tenemos una flora que nos brinda diversidades y variedades de especies para las investigaciones donde se logra identificar nuevos componentes que poseen actividad antimicrobiana. Aproximadamente en nuestro País contamos con una amplia diversidad de más de 24 000 especies que han sido reconocidas, con 17 140 especies de vegetales de este tipo con flores, aproximado de 5 ,345 (32,3%) son especies pertenecientes a nuestra región.¹

El *Origanum vulgare* conocido en nuestro país con el nombre comúnmente llamado orégano, perteneciente al grupo familiar *Lamiaceae*, es muy característica debido a que es una planta aromática que se utiliza mucho en la cocina mediterránea, es leñosa en la base , con troncos herbáceos de aproximadamente 1 m de altura, hojas ovaladas enteras y con superficie punteada ,es originaria de Europa y Asia, se recoge por lo general en nuestras estaciones primaverales y en verano, en especial durante el mes de agosto donde este manifiesta su floración y la peculiaridad de su agradable aroma , están recubiertas por unos vellos glandulares característicos enriquecidos en aceite esencial que al contacto desprenden su aroma característico, estos se deben conservar en recipientes cerrados con tapa hermética, así mismo cabe resaltar que esta es una de las planta condimentaria con mayor significancia en nuestra cocina ,también no debemos dejar de lado sus características y propiedades antisépticas y antioxidantes.²

A nivel mundial la mayoría de las enfermedades del aparato genital femenino son causadas por bacterias y hongos, tenemos la candidiasis vaginal causada por la *Cándida albicans*, dentro de ellas una de las más frecuentes es la vulvovaginitis por el agente mencionado, siendo este causante de un 80 % de los casos,

porcentaje a nivel de Latinoamérica ha ido en incremento dentro de los últimos años.^{2,3}

Dentro de nuestro país es el causante de un 90 % de las infecciones vaginales que son más recurrentes en mujeres jóvenes , a nivel de la libertad se encuentran descritos diversos trabajos de investigación, orientados a la terapia alternativa entre ellos tenemos que es bien tolerado y se encuentra al alcance de la población como son las plantas medicinales, el uso de aceites hechos de plantas medicinales con efecto antibacteriano y antifúngico como es el *Cymbopogon citratus*, *origanum vulgare* , *Calendula officinalis*, pero también hay tratamientos farmacológicos, dentro como son el uso de clotrimazol y fluconazol como fármacos imidazólicos para este tratamiento.³

1.2. TRABAJOS PREVIOS

Chamba L. (Quito, 2015) en este estudio se evaluaron la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* y *Cymbopogon citratus* sobre *C. albicans* en comparación con nistatina, se estableció su capacidad inhibitoria procedimiento con una técnica de arrastre a vapor de agua cono distintas concentraciones (25%, 50%,75% y 100%) en un medio de cultivo bacteriano de 72 horas y así mismo preparación del inóculo a un nivel de turbidez de 0,5 donde utilizo la escala Mc Farland, donde se realizó la siembra en 19 cajas de placa Petri, utilizando el medio de cultivo Dextrosa Sabouraud a T° de 37°C con un halo de inhibición al “100%”con 17,8 mm de halo de inhibición con el aceite de orégano donde se encontraron efectividad antifúngica importante sobre el control de *Cándida albicans*.⁴

Quintanilla J. (Lima 2016) Este estudio se determinó el efecto antibacteriano in vitro del extracto de aceite de orégano, carvacrol, sobre cepas de *Cándida albicans*. La concentración dilucional del extracto fue al 0,1 % in vitro en difusión en disco y la determinación de la CMI. Donde se expuso a *Candida albicans* a cuatro concentraciones del extracto de aceite de carvacol; también se consideró un fármaco como fluconazol y otro con similar eficacia, realizándose diez repeticiones en cada caso. De diez extractos investigados, seis presentaron actividad antifúngica consistente con un diámetro de halos de inhibición >18 mm

en la concentración al 100 % (100mg/ml). Se concluyó que estadísticamente hay significativa entre el efecto antifúngico de las concentraciones de extracto de aceite de orégano relacionado el crecimiento de *Cándida albicans*.⁵

Cabanillas D. (Trujillo-2016) experimentalmente se evaluó la eficacia antimicótica del extracto acuoso de hierba luisa frente a las cepas de *Candida albicans* en comparación con la acción antimicótica del Clotrimazol, con diseño de grupo de control, incluida en línea de investigación de medicina alternativa. Donde se llevó a cabo realizó en un laboratorio realizándose 16 repeticiones de dicho extracto de hierba luisa en diferentes concentraciones, poniéndose a prueba la efectividad antimicótica del fármaco mencionado. Se realizó la incubación de las placas Petri, en posición invertida a 37°C a los 15 minutos siguientes a la aplicación de los discos. La lectura se realizó a las 24 h, posteriores a la aplicación de los discos, donde se observó observa que los halos de inhibición superiores tanto en la concentración de 80 (15.71 mm) y 100 (16.93 mm) comparada con los halos de inicio del clotrimazol (13.19 mm) a una concentración de 80 y al 100 % ,dentro de los valores medidos el halo de inhibición se presentó a un diámetro de 18mm al 100% siendo este valor que presento la sensibilidad de inhibición concluyéndose que si posee efecto antimicótico.⁶

Hernández M. (Lima 2005) en este estudio se evaluaron la actividad antifúngica in vitro de doce extractos etanolicos de especies de plantas medicinales de nuestro medio; *Annona cherimolia* Mill. Se realizaron pruebas biológicas in vitro, por el método de Difusión en Agar frente a *Cándida albicans* cultivada en Agar Sabouraud a 37° C. Se determinó la MIC donde se ensayaron diversas concentraciones de cada extracto donde se observó la inhibición del crecimiento a las concentraciones de 0.0006g/mL. 0.006 g/mL y 0.008g/mL para los extractos metanolicos, en diclorometano y acuoso. El microorganismo que se utilizaron fueron las levaduras *Cándida albicans*, cepa clínica De trece extractos, seis de ellos presentaron actividad antifúngica elevada, con un diámetro de halos de inhibición #18mm, 0,25 ml de extractos etanólicos en placas Petri con medio de

cultivo, dentro de la terapia alternativa con plantas medicinales existe una alta efectividad antibacteriana y antifúngica.⁷

Ludeña M. (Trujillo-2002) se evaluaron la actividad antimicótica de el extracto etanólico de *Psidium acutangulum* mostró una buena actividad antifúngica in vitro *Cándida albicans*; de los extractos se realizó concentración y evaporando del solvente, obteniéndose los extractos secos. Las pruebas biológicas in vitro se realizaron por el método de Difusión en Agar frente a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6928 64, *Candida albicans* ATCC 14053 cultivada en Agar Sabouraud a 37°C. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) se ensayaron a diversas concentraciones de cada extracto observándose con una respuesta inhibitoria al 90% con un valor de 24mm de halo de inhibición sobre las cepas de *Candida albicans*, donde se concluyó que el extracto etanólico de *Psidium acutangulum* mostró una buena actividad antifúngica in vitro frente a diversos hongos patógenos.

1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

Dentro de las patologías causadas por hongos, actualmente han ido aumentando con una alta frecuencia y relevancia clínica en nuestro medio, esto debido al nivel de resistencia e incumplimiento del tratamiento farmacológico , pero hay que tener en cuenta lo siguiente ;Se considera a una mujer con alto riesgo de padecer de una enfermedad de transmisión sexual si presenta los siguientes factores de riesgo: una edad \leq de 25 años con más de una pareja sexual en el último año, sin haber usado métodos anticonceptivos de protección como es el preservativo.⁹

Las infecciones causadas por *Cándida albicans* recientemente hay diversos estudios que refieren este tipo de infección aparece principalmente en individuos defensas bajas, con compromiso del sistema inmune afectando principalmente a la piel y mucosas orales, uñas. Hay que tener en cuenta que dentro de este grupo de riesgo tenemos a los pacientes con cáncer, trasplantados o infectados VIH/SIDA la infección puede generalizarse llegando a provocar candidemia que muchas veces puede llegar a ser mortal si no es tratada a tiempo.¹⁰

La *Cándida albicans* es un tipo de hongo vaginal dismórfico, este se desarrolla en función a los niveles de temperatura para lograr su crecimiento, teniendo como característica en levadura a una temperatura de 27 °C, tiene una forma de levadura se interpreta por tener un aspecto de células redondas, de 3-8 x 2-7 µg, que se presentan en grupos reducidos y es también llamada hongo filamentoso.¹¹

El *origanum vulgare* tiene una diversa variedad de especias, se ha convertido en un producto con vías de exportación, también contiene tipos diversos metabolitos los cuales conforman su estructura química, el p-cimeno conjunto con los derivados fenólicos incluidos el carvacrol y timol estos componentes encontrados en diversas especias como es el orégano. En *O.vulgare* estudios científicos recientes muestran que está compuesto por ácidos coumérico, ferúlico, caféico, rhidroxibenzóico y vainillínico.^{11,12}

Los compuestos que fueron encontrados en *O. vulgare ssp. Hirtum* son el carvacrol, timol, r-cimeno y γ-terpineno, teniendo en cuenta que dentro de la diversidad de estudios por medio de la cromatografía de gases/espectrometría en masas se han logrado identificar aproximadamente de 16 a 56 mezclas de compuestos distintos.¹²

Asimismo en nuestro país como en otras partes del mundo se ha realizado diversos tipos de estudios sobre la eficacia antimicótica de *Oreganum Vulgare*, y su diversidad de tipos de especies, Los factores ambientales son de suma importancia tanto para el número y condición de calidad del aceite esencial de este vegetal, presentan actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, así mismo también tienen actividad contra diversos tipos de candidas, dentro de ellas tenemos *C. albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*.^{12,13}

Dentro de otros efectos que posee el *o.vulgare* se han descrito múltiples efectos dentro de los cuales tenemos efecto antiparasitario, acción estrogénica y como antioxidante, como también diversos usos en los cosméticos y usos medicinales para mejorar la salud con la medicina complementaria.¹³

El uso de agentes antimicóticos hechos a base de aceites esenciales viene siendo estudiado desde años atrás de tal manera que en la actualidad su

investigación y uso cobran mayor importancia, si vemos que su efecto se encuentra en la composición de los monoterpenos como el carvacrol y el timol que son los que se da su acción y actividad antimicótica.¹⁴

Se ha descrito que su mecanismo de acción y actividad antimicótica es debido a la composición hidrofóbica y lipofílica de los monoterpenos y así mismo la composición de fenólicos que son los que actúan en la membrana lipídica de la bacteria, destruyendo los lípidos de la membrana, donde actúan juntamente con diversos tipos de electrones y contenidos celulares, produciéndose la pérdida de las partículas y causando la lisis de los microorganismos.¹⁵

El metronidazol pertenece a la familia de la clase de imidazoles, y su uso dentro de la práctica médica tiene aproximadamente 30 años. La iniciación original de su tratamiento de infecciones micóticas por *cándida albicans*, fue aprobado por la FDA en 1963, en la actualidad lo encontramos disponible en formulación oral, parenteral y vía tópica, este es administrado tradicionalmente en una dosis de 250 a 500 mg tres veces al día por siete días, mostrándose una eficacia del tratamiento hasta en un 90 % de los casos. ^{15,16}

En cuanto la farmacocinética el metronidazol según diversas literaturas, nos menciona que su mecanismo de acción ejerce su efecto antifúngico como también antimicrobiano con una gran cobertura sobre todo para anaerobios mediante el siguiente mecanismo como es, dicho fármaco una vez que se encuentra en el interior de la célula, es reducido al metabolismo intracelular mediante las proteínas transportadoras. Por este motivo a esta alteración la molécula de metabolito activo mantiene un gradiente de concentración el cual se encarga de promover el transporte hacia el interior de la célula. Se promueve la formación de radicales libres que son formados e interaccionan en el ADN celular lo cual conlleva a una pérdida de la estructura de la bacteria, conjuntamente provocando la ruptura de la cadena y la inhibición producida por síntesis de los ácidos nucleicos ocasionando la lisis celular. ¹⁶

Dentro de la sintomatología de la infección por hongos vaginales tenemos la siguiente sintomatología: flujo anormal o leucorrea abundante, disuria, dolor en la zona pélvica, edema, eritema, vaginitis, existen pruebas para establecer el diagnostico como puede ser una tinción Gram, cultivo entre otros. ^{16,17}

Para el tratamiento con metronidazol en pacientes que manifiesten síntomas de descarga vaginal anormal con bajo que hayan tenido de relaciones sexuales sin protección y que inicien un cuadro clínico leve, se puede dar inicio a un tratamiento empírico, teniendo en cuenta las características clínicas de la paciente, así mismo tenemos que tener en cuenta que hay pacientes que presentan cuadros sin sintomatología alguna llámense asintomáticas y que en estas también se debe dar inicio al tratamiento .¹⁸

Por otro lado el tratamiento con metronidazol se debe manejar con debida precaución en el mujeres gestantes debido a que se han descrito durante el periodo de gestación ,presentándose cuadros de aborto, partos pretérmino y ruptura prematura de membranas , endometritis, es por ello que en estas pacientes se opta por buscar otra alternativa de tratamiento que no perjudique al feto , teniendo en cuenta que todas las gestantes deben ser tratadas a tiempo evitar estas complicaciones y posible interrupción del embarazo por el riesgo de infecciones. ^{19,20}

El metronidazol tiene efecto antibiótico y antifúngico. Se ha relacionado con que si es utiliza a largo plazo, puede llevar a producir un aumento en el crecimiento de la flora bacteriana causada principalmente por hongos. Así mismo existen diversos estudios donde se ha demostrado que el uso extendido del metronidazol puede llegar a alterar el pH y la flora vaginal natural conllevando y promoviendo a las infecciones por hongos; lo cual también puede causar el agotamiento de las bacterias lo cual puede inducir a su crecimiento de otros tipos de bacterias dañinas que comprometen al sistema inmunológico. Como podemos observar, en pacientes con un compromiso del sistema inmune con defensas relativamente bajas las cuales no se pueden controlar las infecciones por hongos de forma eficaz, esto en pacientes con VIH. ^{21,22}

1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Es eficaz el extracto acuoso de la hoja de *Origanum vulgare* “orégano” como antimicótico contra *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con Metronidazol a 30 microgramos, en un estudio in vitro?

1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El fin de este trabajo principalmente se basa en el aporte de información para mi persona en mi preparación académica dentro del rubro de la medicina, y además servirá de base científica para posteriores trabajos de investigación, con el propósito de introducir la importancia de las propiedades de esta planta medicinal como es el orégano, “*origanum vulgare*”.

Es por todo ello que me llevo a estudiar un tratamiento medicinal alternativo con una especie de planta medicinal muy común en la sociedad, que la empleamos para diversos usos pero que desconocemos de las propiedades y de su importancia en cuanto a sus propiedades farmacológicas y una de ellas, es que tiene un gran efecto como antimicrobiano y antifúngico en cual será demostrado mediante este estudio, donde vamos a demostrar que el “*origanum vulgare*” tiene similar eficacia que el metronidazol para el tratamiento por este tipo de infección. La terapia farmacológica para este tratamiento actualmente se lleva a cabo con fármacos pertenecientes a la familia de los imidazoles como es clotrimazol, miconazol, metronidazol teniendo en cuenta que el ultimo eficacia de hasta un 90% en estos pacientes con infección por *Cándida albicans*.

1.6. HIPÓTESIS

H1: El extracto acuso de las hojas *Origanum vulgare* “Orégano” es eficaz como antimicótico contra *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con Metronidazol a 30 microgramos, en un estudio in vitro.

H0: El extracto acuso de las hojas *Origanum vulgare* “Orégano” no es eficaz como antimicótico contra *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con Metronidazol a 30 microgramos, en un estudio in vitro.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia antimicótica del extracto acuoso de *Origanum vulgare* “orégano” sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con Metronidazol a 30 microgramos, en un estudio in vitro.

2.7.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Establecer el efecto antimicótico del extracto acuoso de las hojas *Origanum vulgare* al 100%.
- Establecer el efecto antimicótico del extracto acuoso de las hojas *Origanum vulgare* al 75%.
- Establecer el efecto antimicótico del extracto acuoso de las hojas *Origanum vulgare* al 50%.
- Establecer el efecto antimicótico del extracto acuoso de las hojas *Origanum vulgare* al 25%.
- Establecer el efecto antimicótico metronidazol a 30 ug.

II. MÉTODO

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico

DISEÑO DE INVESTIGACION: Experimental con múltiples repeticiones post prueba.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Dónde:

RG: Grupos de estudio

X1: Extracto acuoso de la hoja de *Origanum Vulgare* al 100%

X2: Extracto acuoso de la hoja de *Origanum Vulgare* al 75%

X3: Extracto acuoso de la hoja de *Origanum Vulgare* al 50%

X4: Extracto acuoso de la hoja de *Origanum Vulgare* al 25%

X5: Control positivo: metronidazol 30 µg

X6: Control negativo: Suero fisiológico

O: Observaciones del diámetro del halo de inhibición (post prueba).

2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

- **Variable Independiente:** Agente antimicótico

a) **Agente antibacteriano no farmacológico:** Extracto acuoso de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”.

b) **Agente antibacteriano farmacológico:** Metronidazol 30 µg.

- **Variable Dependiente:** Eficacia antimicótica

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antimicótico	cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo capacidad de supervivencia. ²³	El extracto acuoso de <i>Origanum vulgare</i> “orégano” se dividió en las siguientes diluciones: 100% 75% 50% 25% Metronidazol Agua destilada	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6	Cualitativa nominal
V. D: Eficacia antimicótica	Es la Capacidad de inhibir la micosis ante un agente antimicótico. ²⁴	Test de susceptibilidad micótica Sensible: ≥ 21 mm Intermedio: 16 - 20 mm Resistente: ≤15mm	Eficaz ≥21 mm No eficaz <15 mm	Cualitativa nominal

2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

- **POBLACION:** Constituida por todas las cepas de *Cándida Albicans* ATCC 10231.
- **MUESTRA**

Tamaño de muestra: Se empleó la formula estadística de diferencia de promedio sobre halos de inhibición y se obtuvo una muestra de 19 repeticiones por cada grupo de estudio. (Ver anexo 01)

- **Unidad de análisis:** cada uno de los cultivos de Cepas de *Cándida Albicans* ATCC 10231
- **Unidad de muestra:** Placas Petri con cepas de *Cándida Albicans* ATCC 10231
- **Muestreo:** Se estudian todas las cepas cultivadas.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- Placas Petri con cultivos viables.
- Cepas cultivadas entre 18 a 24 horas.
- Replicaciones de cepas puras y que no tuvieron contacto con ningún tipo de reactivo o medicamento

Criterios de exclusión:

- Se excluyeron las cepas contaminadas *Cándida albicans* ATCC 10231 que no crecieron en los medios de cultivo.
- Cepas sin muestra de crecimiento en medio de cultivo.
- Se excluyeron las placas Petri con medio de cultivo que presentó algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.

3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

LA TÉCNICA: Se realizó la observación directa del crecimiento bacteriano de las placas Petri.

PROCEDIMIENTO: El experimento fue elaborado en las siguientes fases:

- a. La planta fue certificada por la universidad UPAO (ver anexo N°02)
- b. Para obtener el extracto acuoso de *origanum vulgare* “orégano” se realizó mediante la técnica de dilución. (ver anexo N°03).
- c. Para el cultivo de la bacteria se usó el medio de Agar Mueller Hinton. (ver anexo N°04).
- d. Para determinar la sensibilidad, resistencia. Se aplicó el método de kirby-bauer.²⁵ (Ver anexo N°05)

INSTRUMENTO: Se elaboró la ficha de recolección de datos que consistió en registrar: las diluciones de cada grupo de estudio, el control positivo y negativo, y la lectura del tamaño de los halos de inhibición a las 72 horas para evaluar la condición de resistente, intermedio y sensible. (Ver anexo N°06).

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

El instrumento y recolección de datos fue validado por 3 expertos en el área y en relación con las técnicas de laboratorio, que garantizaron que la información recolectada estuviera acorde con los objetivos de la investigación. (Ver anexo N°07).

2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Los datos recolectados se tabularon mediante el programa de Excel 2016, posteriormente se analizó en un programa SSPP versión 25.0, y para los gráficos se utilizó el diagrama de cajas o bigotes.

Se aplicó la prueba estadística para homogenizar la muestra y luego análisis de varianza (ANOVA), para evaluar la diferencia significativa entre los diámetros.

El análisis post ANOVA Tukey permitirán identificar la dilución con la que se obtendrá el mayor tamaño de halo de inhibición.

3.6. ASPECTOS ÉTICOS:

Se seguirán las medidas de bioseguridad del Ministerio de Salud.²⁶

Del mismo modo se considerará la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad De Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

Normas de bioseguridad de laboratorio de la OMS.²⁶ (Ver Anexo 08)

III. RESULTADOS

Tabla 01: efecto antimicótico del extracto acuoso de la hoja de *Origanum vulgare* “orégano” como antimicótico contra *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con Metronidazol a 30 microgramos, en un estudio in vitro.

DESCRIPTIVO

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
100%	10	14.50	1.080	.342	13.73	15.27	13	16
75%	10	11.10	.568	.180	10.69	11.51	10	12
50%	10	.00	.000	.000	.00	.00	0	0
25%	10	.00	.000	.000	.00	.00	0	0
Metronidazol	10	25.90	.876	.277	25.27	26.53	25	27
Total	50	10.30	9.855	1.394	7.50	13.10	0	27

FUENTE: Reporte de resultados del SPSS Ver. 0.2

Tabla 02: efecto antimicótico del extracto acuoso de la hoja de *Origanum vulgare* “orégano” como antimicótico contra *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con Metronidazol a 30 microgramos, en un estudio in vitro

ANALISIS DE VARIANZA ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4738.200	4	1184.550	2625.850	.000
Dentro de grupos	20.300	45	.451		
Total	4758.500	49			

FUENTE: Reporte de resultados del SPSS Ver. 0.25

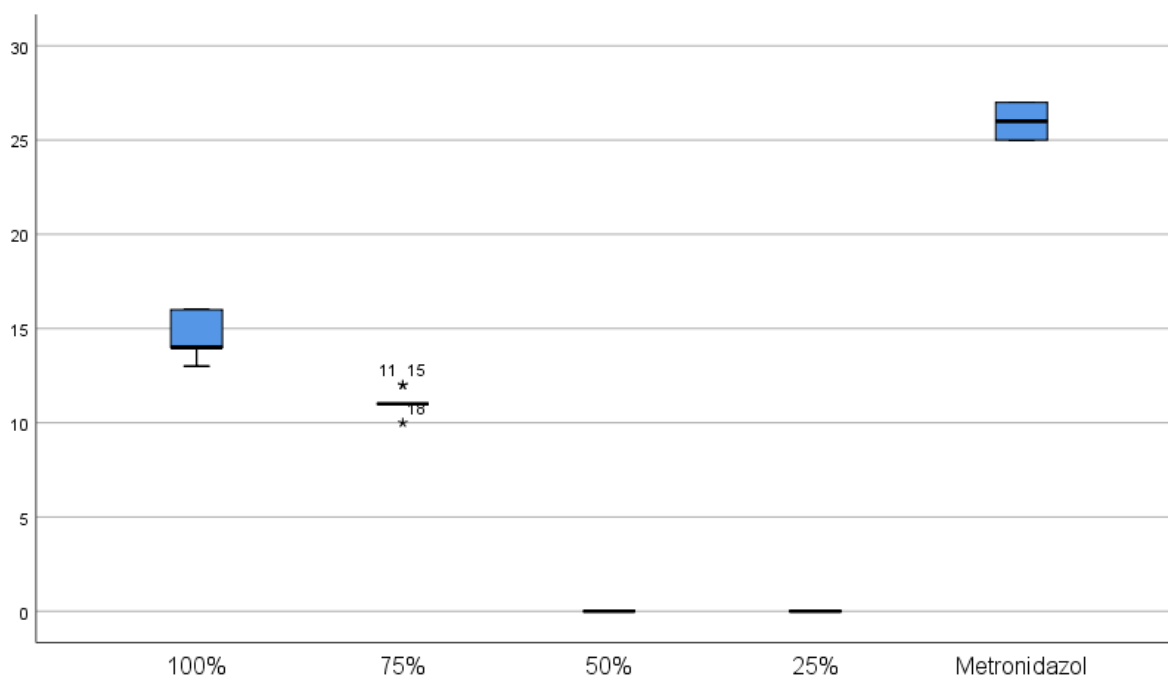
Tabla 03: efecto antimicótico del extracto acuoso de la hoja de *Origanum vulgare* “orégano” como antimicótico contra *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con Metronidazol a 30 microgramos, en un estudio in vitro

PRUEBAS POST HOC DE TUKEY

		Subconjunto para alfa = 0.05			
	N	1	2	3	4
50%	10	.00			
25%	10	.00			
75%	10		11.10		
100%	10			14.50	
Metronidazol	10				25.90
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

FUENTE: Reporte de resultados del SPSS Ver. 0.25

Gráfico 01: efecto antimicótico del extracto acuoso de la hoja de *Origanum vulgare* “orégano” como antimicótico contra *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con Metronidazol a 30 microgramos, en un estudio in vitro



IV. DISCUSIÓN:

Con la finalidad de evaluar el efecto antimicótico del extracto acuoso de *Origanum vulgare* “orégano” sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, comparado con metronidazol a 30 microgramos; donde se observó 10 placas con un total de 65 cultivos. En cada placa Petri se colocaron un total de 5 discos de los cuales 4 de ellos presentaban los extractos etanólico de *Origanum vulgare* “orégano” a distintas concentraciones (100%, 75%, 50%, 25%) y 1 disco de metronidazol como grupo control positivo (tratamiento estándar) y suero fisiológico (SF) DMSO como grupo control negativo.

En la Tabla 01, se observa que a las concentraciones de 25% y 50% no se evidenció efecto inhibitorio, a la concentración de 75% muestra un halo de inhibición 11.10 (DS: 5.68 ± 0.180 . IC95% (10.60 -11.51)) con un rango de 10 a 12 mm; siendo mayor el halo de inhibición a la concentración del 100% con 14.50 mm (DS: 1.080 ± 0.342 IC95% (13.73-15.27)) con un rango de 13 a 16 mm, sin embargo, su efecto antimicótico fue menor que lo considerado por el CLSI (≥ 21 mm sensible) catalogándose como resistente a *Cándida a*. El grupo control con metronidazol, tuvo un halo de inhibición de 25.90 mm (DS: 8.76 ± 2.77 IC95% (25.27-26.53)) con un rango de 25 a 27 mm de halo de inhibición considerándose que en el estudio es sensible para *Cándida a*.

En la Tabla 02, el análisis estadístico ANOVA mostró ser altamente significativo (0.000) en relación a los datos obtenidos, indicando que el extracto de etanólico del *Origanum vulgare* si tuvo efecto antimicótico, pero no supera al del metronidazol. Esto se ve corroborado por la prueba Post ANOVA de Tukey por lo cual se homogéneos (tabla 03, Test de T que demuestra que los grupos fueron homogéneos, que a mayor concentración del extracto etanólico de *Origanum vulgare*, aumenta el halo de inhibición y que metronidazol tiene mayor efecto antimicótico sobre *Cándida a*. En el Gráfico 01 se puede observar mejor al compararse la medida de los halos de inhibición de los grupos de estudio.

Según Quintanilla J. et al. (Lima 2016) Este estudio se determinó el efecto antibacteriano in vitro del extracto de aceite de orégano, carvacrol, sobre cepas de *Cándida albicans*. Donde se expuso a cuatro concentraciones del extracto de aceite de carvacol; De diez extractos investigados, seis presentaron actividad antifúngica consistente con un diámetro de halos de inhibición >18 mm en la concentración al 100 % (100mg/ml). Concluyéndose que estadísticamente hay significativa entre el efecto antifúngico de las concentraciones de extracto de aceite de orégano relacionado el crecimiento de *Cándida albicans*.

Así mismo Cabanillas D. (Trujillo-2016) experimentalmente se evaluó la eficacia antimicótica del extracto acuoso de hierba luisa frente a las cepas de *Candida albicans* en comparación con la acción antimicótica del Clotrimazol, donde se llevó a cabo realizó en un laboratorio realizándose 16 repeticiones, se observó observa que los halos de inhibición superiores tanto en la concentración de 80 y al 100 % ,dentro de los valores medidos el halo de inhibición se presentó a un diámetro de 18mm al 100% siendo este valor que presento la sensibilidad de inhibición concluyéndose que si posee efecto antimicótico.

De la misma manera María H. et al. (Lima 2005) en este estudio se evaluaron la actividad antifúngica in vitro de doce extractos etanolicos de especies de plantas medicinales de nuestro medio; *Annona cherimolia* Mill frente a *Cándida albicans* El microorganismo que se utilizaron fueron las levaduras *Cándida albicans*, cepa clínica De trece extractos, seis de ellos presentaron actividad antifúngica elevada, con un diámetro de halos de inhibición 18mm, 0,25 ml donde se evidencia nivel significativo para la terapia alternativa con plantas medicinales existe una alta efectividad antibacteriana y antifúngica.

Por último, Méndez Iudeña. et al. (Trujillo-2002) se evaluaron la actividad antimicótica de el extracto etanólico de *Psidium acutangulum* mostró una buena actividad antifúngica in vitro *Cándida albicans*; las pruebas biológicas in vitro se realizaron por el método de Difusión en Agar frente a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6928 64, *Candida albicans* ATCC dentro de las concentraciones se evidencio que al 90%, se obtuvo valor de 24mm de halo de

inhibición ,donde se concluyó que el extracto etanólico de *Psidium acutangulum* mostró una buena actividad antifúngica in vitro frente a diversos hongos patógenos.

En resumen se debe tener en cuenta que las diferencias encontradas en los resultados de los antecedentes y los de nuestra investigación, se puede aportar la diferencia de nuestros resultados con los de otro trabajos puede estar condicionado o influenciado por el medio ambiente en el que se desarrolló el cultivo de la planta, en relación a la humedad, temperatura ,altitud y componentes de terreno, elementos que influyen sobre el desarrollo y crecimiento de la planta y hasta podrían estar alterando los componentes químicos y biológicos de la misma.

Ciertas condiciones antes mencionadas, determinan en las plantas la concentración de minerales, micronutrientes, entre otros elementos que son útiles al hombre, lo que explicaría la diferencia en los halos de inhibición en los diferentes países estudiados.

Los resultados que se obtuvieron nos brindan nuevas posibilidades de tratamiento y de un mayor desarrollo de la investigación clínica y farmacológica, para poder lograr alternativas de tratamiento representa una alternativa natural, eficaz y de bajo costo para el tratamiento contra las patologías ginecológicas como es una de las más frecuentes la candidiasis vaginal que muchas veces se presenta con mayor frecuencia en gestantes y en la población femenina. Se considera el uso del extracto acuoso como una alternativa terapéutica a utilizar, como antifúngico tópico tanto por vía oral y/o vaginal, debiéndose realizar diversos estudios con el fin de lograr ofrecer un producto de adecuada calidad a nuestra población.

IV. CONCLUSIÓN:

1. El extracto acuoso de acuso de las hojas *Origanum vulgare* “Orégano” tuvo efecto antimicótico sobre las cepas de *Cándida albicans* ATCC10231 a concentraciones de 75% y 100%, pero no superaron los valores establecidos por el CLSI (≥ 21 mm), por lo cual se le considera resistente para *Cándida albicans*.
2. Los extractos acuosos de las hojas *Origanum vulgare* “Orégano” a las concentraciones de 25% y 50% no tuvieron efecto antimicótico.
3. El metronidazol a 30 μ g tuvo efecto antimicótico sobre de cepas de de *Cándida albicans* ATCC10231, considerándose sensible según el CLSI.

V. RECOMENDACIONES

1. Ejecutar nuevos estudios in vivo con animales de bioterio a fin de evaluar su acción antimicótica en seres vivos.
2. Ampliar otros estudios para determinar el espectro de actividad antifúngica *Origanum vulgare* “Orégano”, en otras formas de concentrados, como aceite esencial o extracto acuoso.
3. Evaluar el efecto inhibitorio del crecimiento antimicrobiano con otros agentes patógenos.
4. Evaluar el uso de este producto como tratamiento coadyuvante con antibióticos.
5. Promover el uso de este producto natural, así mismo estudiar su cultivo y desarrollo para evidenciar una mejora su espectro y eficacia de acción en las investigaciones futuras a realizarse en nuestro país.

VI. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. María P, Vilma G. Las Plantas Medicinales del Perú: Los análisis fitoquímicos en estudios etnobotánicos experiencias en Perú. Los análisis fitoquímicos en estudios etnobotánicos. Madrid ;2010.115-125.
(Citado:20/08/17)
Disponible en:
<http://www.reduniversitaria.es/ficheros/Plantas%20medicinales.%20LIBRO.pdf>
2. Luz María, Muñoz Centeno. Plantas Medicinales Españolas: Origanum Vulgare L. (lamiaceae) (orégano). Acta Botánica Malacitana. 2002: (274-276).
(citado:20/08/17). Disponible en:
http://www.biolveg.uma.es/abm/Volumenes/vol27/27_MunozCenteno.pdf
3. Javier P, Cortés F, Uribarren B, Castañón O. Candidosis Vaginal: Revisión de la literatura y situación de México y otros países. Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira. 1995-2017: 2-5
(citado:20/08/17). Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v23n1/v23n1a09.pdf>.
4. Lupe Marista, Chamba Pascal. Efecto antifúngico del aceite esencial del origanum vulgare (orégano) y cymbopogon citratus (hierba luisa), sobre cepas de candida albicans en comparación con la nistatina estudio invitro. Biotecnología Vegetal, julio, Quito, (2015) (citado:20/08/17). Disponible en:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/3538>.
5. Juan quintanilla,B (Lima 2016) efecto antibacteriano in vitro del carvacrol (aceite de orégano) sobre candida albicans. (Citado 20/08/17). Disponible en:
<http://intranet.uwiener.edu.pe/univwiener/portales/centroinvestigacion/document>
6. Cabanillas Espinoza, D. Eficacia antimicótica del extracto acuoso de Cymbopogon citratus “Hierba luisa” comparada con Clotrimazol, sobre Cándida albicans. Estudio in vitro. (2016) (citado:20/08/17).

7. María H, Julio R. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida Albicans* y *Aspergillus Niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Lima;2005.16-24. (citado:20/08/17).
Disponible en:
http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1278/1/Huamani_am.pdf
8. Wen L, Fernández I, Mohamed H, Espinoza G. Actividad antimicótica de cuatro extractos de *Spondias mombin* en *Candida albicans* in vitro [Tesis I]. Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo; 2002. Disponible en:
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v77n3/a05v77n3>
9. Berek y Novak. Ginecología. Trastornos de las vías urinarias inferiores. Madrid: Barcelona;1998.
10. Jiménez C, Riaño D, Moreno E, Jabbour N, R.Strasburger: TRATADO DE BOTANICA. Barcelona:2004.
11. Tamayo LS, Guevara E, IB L. Tratamiento de la Vaginosis bacteriana candidiasis y tricomoniasis Colombia 2008. Medellín 2008.87-100.
12. Bruce A, Dennis B, Karel H, Alexander J, Julián L. Introducción a la Biología Celular. 3° Ed; Argentina :2011.
13. Cynthia C, Guadalupe L, Salvador U, Elvira G. PROPAC; Iniciación a la Botánica: El orégano; propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes; Barcelona: Masson: 2001.
14. María Pareguilar, María G, Gastélum F, Ramón S, Guadalupe N. Efecto antimicrobiano del orégano mexicano y de su aceite esencial sobre cinco especies del género. Rev. Fitotec. Mex. Vol.30(3):261-267,2007. (Citado20/08/17).
Disponible en <http://www.redalyc.org/html/610/61003008/>
15. Peter JB, Greening A, Crompton GK. Las Plantas y sus Propiedades: producción de orégano. Gobierno federal EE.UU.2002. (Citado20/08/17).
Disponible <http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/OREGANO.pdf>
16. Claudia A, Mónica Z, Rosa M, Susana M. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. FCA UNCUYO. Tomo 43; 2011. 237-245. (Citado20/08/17).

Disponible en: http://revista.fca.uncu.edu.ar/images/stories/pdfs/2011-01/T43_Nc02_Amadio.pdf.

17. Víctor P, Salomón Z, Marco A, Guía farmacológica nacional MINSA 2013, cap.4: ANTIMICROBIANOS. Perú: Lima;1994.122-132. (Citado 20/08/17).
18. José L, Marisa F. Ginecología y Obstetricia: Manual de Consultas Rápidas. Editorial Médica Panamericana; Barcelona:2014.
19. Bertram G. Katzung M. Manual moderno de Farmacología Básica y Clínica: Antimicóticos. Mexico;2005. 785-792.
20. Tamayo LS, Guevara E, IB L. Tratamiento de la Vaginosis bacteriana candidiasis y tricomoniasis Colombia 2008. Medellín 2008.87-100.
21. Bruce A, Dennis B, Karel H, Alexander J, Julian L. Introducción a la Biología Celular. 3° Ed; Argentina :2011.
22. Jorge G, Roberto C, Antonio L. Ginecología obstetricia y reproducción humana. Editorial Médica Panamericana; Madrid:2016.
23. Víctor S, Nancy H. Revista de investigación clínica: Antimicóticos; La Paz:2012. (Citado 29/07/18). Disponible en:
http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682012001000010&script=sci_arttext
24. García Bermejo J. Silva García M. Manual del técnico superior de laboratorio de análisis clínicos. Módulo II. México. Editorial MAD.S.L. 2004.
25. Rosa S, Jorge V. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima, Perú: 2002.
(Citado 29/07/18). Disponible en:
<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
26. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra Edición. OMS. Disponible en:
http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf (citado 29/07/18).

VII. ANEXOS

ANEXO 01

TAMAÑO DEMUESTRA

$$n = \left(\frac{\left(\frac{Z_{\alpha}}{2} + Z_{\beta} \right)^2 (P_1 Q_1 + P_2 Q_2)}{(P_1 - P_2)^2} \right)$$

$$n = \left(\frac{(1.96 + 0.84)^2 ((0.18)(0.82) + (0.169)(0.831))}{(0.18 - 0.169)^2} \right)$$
$$n = \left(\frac{(2.8)^2 ((0.1476) + (0.1404))}{(0.011)^2} \right)$$

Donde:

$P_1=0.18$ (Referencia número 07)

$P_2=0.169$ (Referencia número 06)

$Q_1= 0.82$

$Q_2=0.83$

$Z^{\alpha}/2= 1.96$

$Z_{\beta}= 0.84$

$n=18,663 \Rightarrow 19$ repeticiones como mínimo.

ANEXO 02

PROCEDIMIENTO PARA LA EXPERIMENTACIÓN

El experimento fue elaborado en las siguientes fases:

- a. DETERMINACION TAXONÓMICA DE LA PLANTA POR EL HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO) – UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO TRUJILLO PERÚ.

 **UPAO** | Museo de Historia Natural y Cultural

HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

CONSTANCIA N° 66-2018-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

CONSTANCIA

Que **Jennifer Alexandra Alva Pretell**, estudiante de la carrera profesional de Medicina Humana de la Universidad César Vallejo, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

Origanum vulgare L. (Lamiaceae)

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: "Eficacia antimicótica del extracto acuoso de *Origanum vulgare* "orégano" sobre *Candida albicans* ATCC 10231, comparado con metronidazol, estudio *in vitro*".

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 29 de noviembre de 2018

 
Mg. Segundo Leiva González
Director
Museo de Historia Natural y Cultural

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

Av. América Sur 3145 Monserrate Trujillo - Perú

ANEXO 03

Obtención del extracto acuso *oreganum vulgare* orégano” se realizó mediante la técnica de dilución.

1. Tratamiento de la muestra

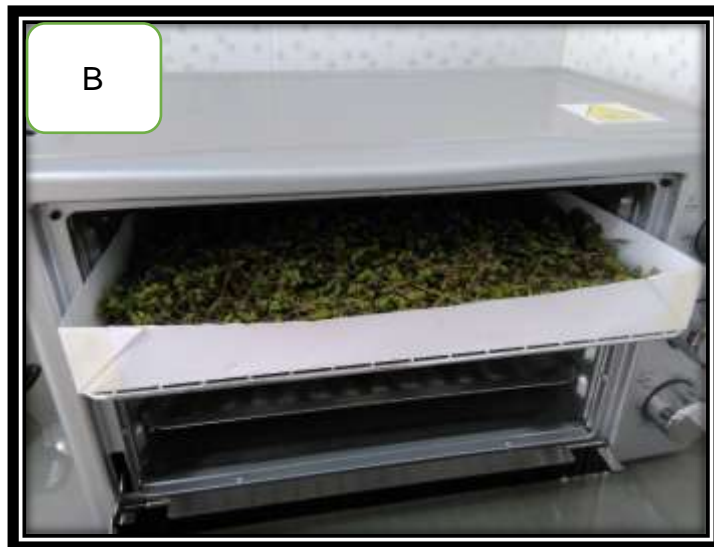
Las plantas frescas de *oreganum vulgare* “orégano” se obtuvieron en el mercado La Hermelinda de Trujillo, en una cantidad de 2 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron las hojas con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujaron manualmente las hojas secas hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).



2. Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico de *oreganum vulgare* “orégano” se obtuvo por el método de maceración en alcohol etílico de 96°; para ello, se colocó en un frasco de vidrio 20 g de MS y 100 ml de alcohol etílico 96°, y se llevó a una estufa a 40°C por 8 días con agitación constante. Después, se hizo una doble filtración. Primero se filtró a través de una gasa estéril y segundo a través de un papel filtro Whatman N°41. Este filtrado, se regresó a la estufa por 1-2 días más, hasta que el filtrado se evaporó, por lo menos, 3/4 partes.

De este modo, se obtuvo el extracto etanólico (EE) considerado al 100%; el cual, se reservó en un frasco de vidrio ámbar a 4°C hasta su utilización.





F



G



ANEXO 04

3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Sabouraud como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.







ANEXO 05

4. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M44-A2 y M60.

a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Cándida albicans* ATCC 10231, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml).

b) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Cándida albicans* ATCC 10231, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

c) Preparación de las concentraciones del EE

A partir del EE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750 µL de EE y 250 µL de DMSO al tubo de 75%, 500 µL de EE y 500 µL de DMSO al tubo de 50%, y 250 µL de EE y 750 µL de DMSO al tubo de 25%.

d) Preparación de los discos de sensibilidad con EE

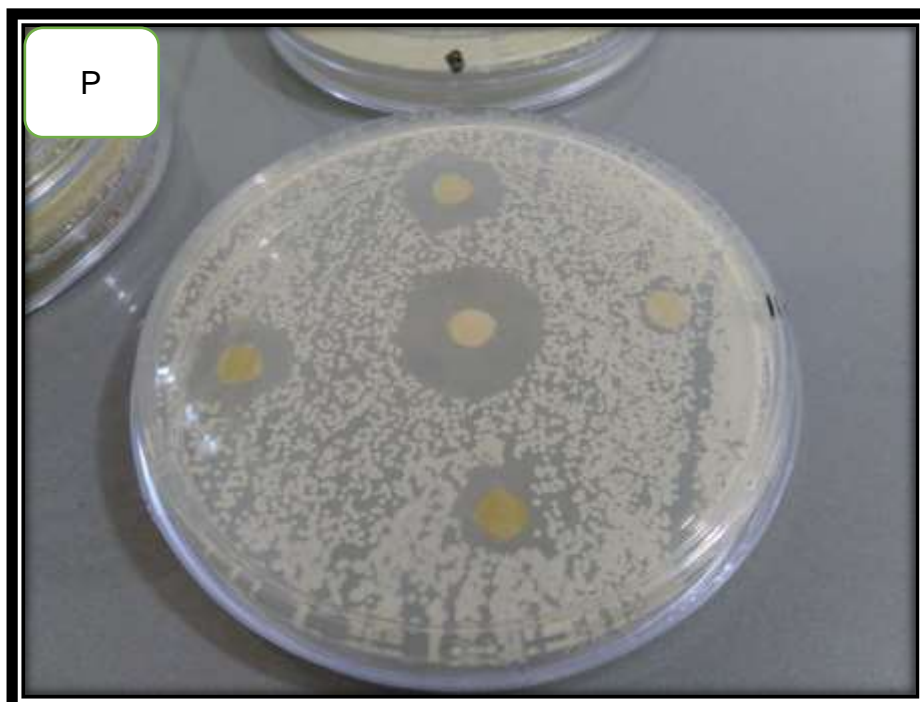
A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 µL en cada disco de papel filtro Whatman N°41 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 µL de EE al 25% y se colocó en un disco, 10 µL de EE al 50% en otro disco, 10 µL de EE al 75% en otro disco y 10 µL de EE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.

e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicótico

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con EE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Cándida albicans* ATCC 10231, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con metronidazol (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

f) **Lectura e interpretación**

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de EE de *oreganum vulgare* “orégano” y para el metronidazol. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M60 del CLSI.



ANEXO N°06

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA MEDIR EL TAMAÑO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN SOBRE CEPAS DE *Cándida albicans*

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Nº	Extracto etanólico de orégano				Metronidazol	suero fisiológico
	100%	75%	50%	25%		
1	16	12	0	0	25	0
2	14	11	0	0	25	0
3	16	11	0	0	26	0
4	14	11	0	0	25	0
5	13	12	0	0	27	0
6	14	11	0	0	27	0
7	14	11	0	0	26	0
8	14	10	0	0	27	0
9	16	11	0	0	26	0
10	14	11	0	0	25	0

ANEXO 07

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO (Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)		CONSTRUCTO (Hasta dónde el instrumento mide realmente la variable, y con cuánta eficacia lo hace)		RELEVANCIA (El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)		COHERENCIA INTERNA (El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)		CLARIDAD (El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)		SUFICIENCIA (Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	✓		✓		✓		✓		✓		✓	
2	✓		✓		✓		✓		✓		✓	
3	✓		✓		✓		✓		✓		✓	

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos				✓		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación				✓		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial				✓		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir				✓		
VALIDEZ						
APLICABLE	✓	NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN		

Instrumento validado por:


Mg. Elvira J. Rodríguez Ramírez
ESPECIALISTA ANALISIS CLINICO E BIOLÓGICO
C.B.P. 1543

Firma y sello


Dr. Diana Alexandra Contreras Salazar
PSICÓLOGA - CLINICA
LICENCIADA EN PSICOLOGIA
C.B.P. 1543

Firma y sello


20/15275

Firma y sello

ANEXO 08

▪ Acceso:

Sólo podrá entrar en las zonas de trabajo del laboratorio el personal autorizado.

Protección personal:

1. El investigador usará en toda su permanencia en el laboratorio, batas o uniformes especiales.
2. En todo procedimiento dentro del laboratorio, se usarán guantes protectores apropiados con el fin de evitar cualquier contacto directo o accidental con cultivos micóticos y otros materiales potencialmente infecciosos. Luego de haberlos utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica.
3. El investigador se lavará las manos luego de manipular materiales infecciosos, así como antes de dejar el laboratorio.
4. Dentro del laboratorio estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.²⁶

Cuadro 11. Equipo de protección personal

EQUIPO	PELIGRO EVITADO	CARACTERÍSTICAS DE SEGURIDAD
Batas y monos de laboratorio	Contaminación de la ropa	<ul style="list-style-type: none">• Abertura trasera• Cubren la ropa de calle
Delantales de plástico	Contaminación de la ropa	<ul style="list-style-type: none">• Impermeables
Calzado	Impactos y salpicaduras	<ul style="list-style-type: none">• Puntera cerrada
Gafas de máscara	Impactos y salpicaduras	<ul style="list-style-type: none">• Lentes resistentes a los impactos (con corrección óptica o bien deben usarse sobre las lentes correctoras)• Protección lateral
Gafas de seguridad	Impactos	<ul style="list-style-type: none">• Lentes resistentes a los impactos (con corrección óptica)• Protección lateral
Viseras	Impactos y salpicaduras	<ul style="list-style-type: none">• Protegen todo el rostro• Se retiran fácilmente en caso de accidente
Mascarillas respiratorias	Inhalación de aerosoles	<ul style="list-style-type: none">• Varios diseños disponibles: desechables, de un solo uso; purificadoras de aire, de cara entera o de media cara; purificadoras de aire eléctricas, de cara entera o con capucha; con suministro de aire
Guantes	Contacto directo con microorganismos	<ul style="list-style-type: none">• De látex, vinilo o nitrilo, aprobados para uso microbiológico, desechables• Protección de las manos
	Punciones o cortes	<ul style="list-style-type: none">• De malla

ANEXO 09

		Estadístico de Levene		gl1	gl2	Sig.
VAR00001	Se basa en la media	13.255		4	45	.000
	Se basa en la mediana	4.500		4	45	.004
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	4.500		4	18.294	.011
	Se basa en la media recortada	13.458		4	45	.000

ANEXO 10

COMPARACIONES MULTIPLES

(I) VAR00002	(J) VAR00002	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
100%	75%	3.400*	.300	.000	2.55	4.25
	50%	14.500*	.300	.000	13.65	15.35
	25%	14.500*	.300	.000	13.65	15.35
	Metronidazol	-11.400*	.300	.000	-12.25	-10.55
75%	100%	-3.400*	.300	.000	-4.25	-2.55
	50%	11.100*	.300	.000	10.25	11.95
	25%	11.100*	.300	.000	10.25	11.95
	Metronidazol	-14.800*	.300	.000	-15.65	-13.95
50%	100%	-14.500*	.300	.000	-15.35	-13.65
	75%	-11.100*	.300	.000	-11.95	-10.25
	25%	.000	.300	1.000	-.85	.85
	Metronidazol	-25.900*	.300	.000	-26.75	-25.05
25%	100%	-14.500*	.300	.000	-15.35	-13.65
	75%	-11.100*	.300	.000	-11.95	-10.25
	50%	.000	.300	1.000	-.85	.85
	Metronidazol	-25.900*	.300	.000	-26.75	-25.05
Metronidazol	100%	11.400*	.300	.000	10.55	12.25
	75%	14.800*	.300	.000	13.95	15.65
	50%	25.900*	.300	.000	25.05	26.75
	25%	25.900*	.300	.000	25.05	26.75

ANEXO 11



San Jose
LABORATORIO CLINICO
Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde la Srta. ALVA PRETELL JENNIFER ALEXANDRA, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Eficacia antimicótica del extracto acuoso de *Origanum vulgare* "orégano" sobre *Candida albicans* ATCC 10231 comparado con Metronidazol. Estudio in vitro", durante los días 29 de julio al 2 de agosto de 2018, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud de la estudiante, solo para fines académicos, a los 3 días del mes de agosto de 2018.



José Luis Calla Quispe
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 0301